

Nota aplikacyjna

Nr 0001

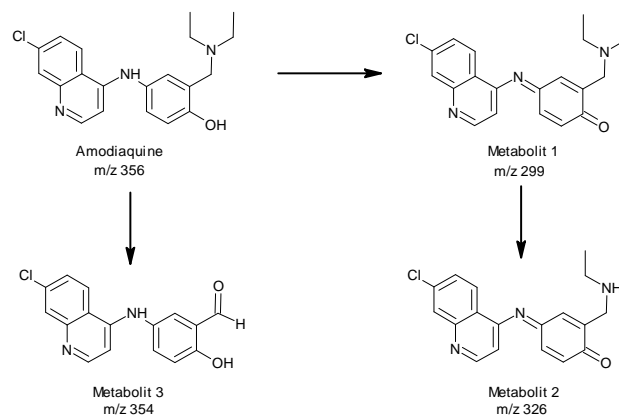
Symulacja metabolizmu amodiaquine z zastosowaniem systemu elektrochemicznego ROXY™ (Antec) w połączeniu z LC/MS-2020 (Shimadzu)

Amodiaquine (AQ) to związek chemiczny stosowany jako lek przeciwzapalny oraz antymalaryczny w terapii malarii wywołanej przez *Plasmodium falciparum*. Lek ten został wycofany z rynku farmaceutycznego w Stanach Zjednoczonych z powodu swojej hepatotoksyczności, jednak dalej jest stosowany w krajach afrykańskich w leczeniu malarii.

Amodiaquine jest metabolizowany w organizmie człowieka do reaktywnych metabolitów, których wykrycie *in vivo* jest niemożliwe z powodu natychmiastowych reakcji następczych, prowadzących do powstania stabilnych produktów. Głównym produktem metabolizmu wątrobowego amodiaquine jest iminochinon, który ulega reakcji N-dealkilacji. Kolejnym metabolitem jest odpowiedni aldehyd, wykazujący znacznie większą trwałość. Wybrane metabolity oraz odpowiednie szlaki metaboliczne dla amodiaquine przedstawiono na **Rys. 1** oraz opisano w **Tabeli 1**.

Amodiaquine wybrano jako modelowy lek do badania metabolizmu oksydacyjnego z zastosowaniem systemu elektrochemicznego ROXY™ (Antec).

Pomyślnie przeprowadzono elektrochemiczne utlenianie badanego związku uzyskując metabolity Fazy I, które następnie poddano reakcji sprzęgania z glutationem (GSH). Powstałe produkty utleniania i sprzęgania poddano analizie za pomocą spektrometru masowego LC/MS-2020 (Shimadzu).



Rys. 1 Fragment szlaku metabolicznego amodiaquine

Tabela 1 Amodiaquine i wybrane metabolity

Związek	Wzór	Masa monoizotopowa [Da]
Amodiaquine	C ₂₀ H ₂₂ ClN ₃ O	355,1
Metabolit 1	C ₂₀ H ₂₀ ClN ₃ O	353,1
Metabolit 2	C ₁₈ H ₁₆ ClN ₃ O	325,1
Metabolit 3	C ₁₆ H ₁₁ ClN ₂ O ₂	298,1

MATERIAŁY I METODY

Do symulacji metabolizmu zastosowano system elektrochemiczny ROXY™ (Antec). System ten wyposażony jest w potencjostat, celę elektrochemiczną ReactorCell™, pompę strzykawkową oraz niezbędne połączenia. Do obsługi urządzenia zastosowano oprogramowanie Dialogue (Antec). Reakcje prowadzono z zastosowaniem elektrody pracującej, wykonanej z węgla szklanego (GC, ang. Glassy Carbon). Jako elektrodę odniesienia zastosowano elektrodę Pd/H₂, HyREF™ (Antec). Parametry elektrochemicznego utleniania przedstawiono w Tabeli 2.

Tabela 2 Parametry elektrochemicznego utleniania

Parametr	Opis
Potencjostat	ROXY™ (Antec)
Cela pomiarowa	ReactorCell™ (Antec)
Elektroda pracująca	GC
Elektroda odniesienia	HyREF™ (Antec)
Stosowany potencjał	scan 0 – 2000 mV
Elektrolit	20 mM mrówczan amonu (pH 7,4), 50% acetonitryl

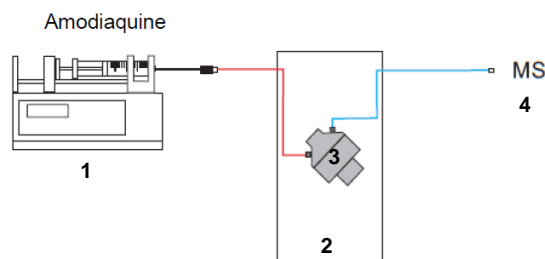
Roztwór amodiaquine o stężeniu 10 µM w 20 mM mrówczanie amonu o pH 7,4 z dodatkiem 50% acetonitrylu był podawany z pompy strzykawkowej z szybkością 10 µl/min. Jako detektor posłużył spektrometr masowy LC/MS-2020 (Shimadzu) wyposażony w źródło jonów typu DUIS pracujące w trybie electrospray (ESI) rejestrując jony dodatnie. Parametry rejestracji widm masowych przedstawiono w Tabeli 3. Analizę danych pomiarowych przeprowadzono z zastosowaniem oprogramowania LabSolutions (Shimadzu).

Tabela 3 Parametry rejestracji widm masowych

Parametr	Opis
Spektrometr	LC/MS-2020 (Shimadzu)
Zakres m/z	50 – 750
Jonizacja	Dodatnia
DL Temperature	250°C
Heat Block	350°C
Nebulizer	1,0 l/min
Dry gas	OFF
Detector Voltage	Default (Tuning File)
Interface Voltage	4,5 kV
DL Voltage	Default (0 V)
Qarray DC Voltage	Default (0 V)

Symulacja metabolizmu Fazy I

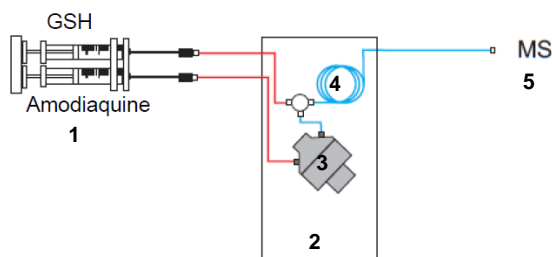
10 µM roztwór amodiaquine w 20 mM mrówczanie amonu o pH 7,4 z dodatkiem 50% acetonitrylu tłoczono do celi elektrochemicznej ze stałą szybkością przepływu wynoszącą 10 µl/min, za pomocą pompy strzykawkowej. Wylot celi został bezpośrednio połączony *on-line* ze źródłem jonów spektrometru masowego, co umożliwiło pomiar widm masowych dla produktów elektrochemicznego utleniania dla różnych potencjałów. Potencjał elektrody pracującej zwiększano liniowo od 0 do 2000 mV z szybkością 10 mV/s, dzięki czemu zarejestrowano odpowiednie voltamogramy masowe. Całkowity czas analizy wyniósł około 5 min. Schemat stosowanej aparatury przedstawiono na Rys. 2.



Rys. 2 Schemat aparatury do symulacji metabolizmu fazy I (1 – pompa strzykawkowa, 2 – potencjostat, 3 – cela elektrochemiczna, 4 – spektrometr masowy)

Symulacja metabolizmu fazy II

Analogicznie jak dla symulacji metabolizmu Fazy I, roztwór amodiaquine o stałym stężeniu w buforze mrówczanowo-amonowym (pH 7,4) został wprowadzony do celi elektrochemicznej z szybkością 10 µl/min. Powstałe produkty opuszczające celę elektrochemiczną były mieszane z roztworem glutationu o stężeniu 100 µM w buforze mrówczanowo-amonowym. Pomiedzy mieszalnikiem a spektrometrem masowym umieszczono reaktor o objętości 100 µl, uzyskując opóźnienie wynoszące 5 min. Szybkość wprowadzania roztworu glutationu wynosiła 10 µl/min. Schemat stosowanej aparatury przedstawiono na Rys. 3. Metabolity amodiaquine przeznaczone do reakcji sprzęgania z glutationem zostały wygenerowane stosując stałe potencjały wynoszące odpowiednio 400 mV dla metabolitu 1 oraz 1200 mV dla metabolitów 2 i 3.



Rys. 3 Schemat aparatury do symulacji metabolizmu Fazy II (1 – pompa strzykawkowa, 2 – potencjostat, 3 – cela elektrochemiczna, 4 – reaktor, 5 – spektrometr masowy)

Analiza LC-MS produktów utleniania

Produkty utleniania elektrochemicznego amodiaquine zostały zebrane odpowiednio dla 400 mV i 1200 mV, a następnie rozcieńczone 10-krotnie przy pomocy 0,1% roztworu kwasu trifluorooctowego w wodzie i poddane analizie LC-MS. Stosowano system UHPLC Nexera (Shimadzu) w połączeniu ze spektrometrem masowym LC/MS-2020 (Shimadzu). Rozdział chromatograficzny przeprowadzono na kolumnie ze złożem typu PFP (*ang.* pentafluorophenyl) (Phenomenex). Dokładne parametry rozdziału chromatograficznego przedstawiono w Tabeli 4. Spektrometr masowy pracował w trybie SIM (*ang.* Single Ion Monitoring), zgodnie z parametrami przedstawionymi w Tabeli 5.

Tabela 4 Parametry rozdziału chromatograficznego

Parametr	Opis
System chromatograficzny	Nexera (Shimadzu)
Detektor	LC/MS-2020 (Shimadzu)
Kolumna	złożo 2,6 µm PFP 100 Å 100 × 2,1 mm
Faza ruchoma	Faza A: 2% ACN, 0,1% FA Faza B: 80% ACN, 0,1% FA
Gradient	5-100% fazy B w 20 min.
Przepływ	400 µl/min

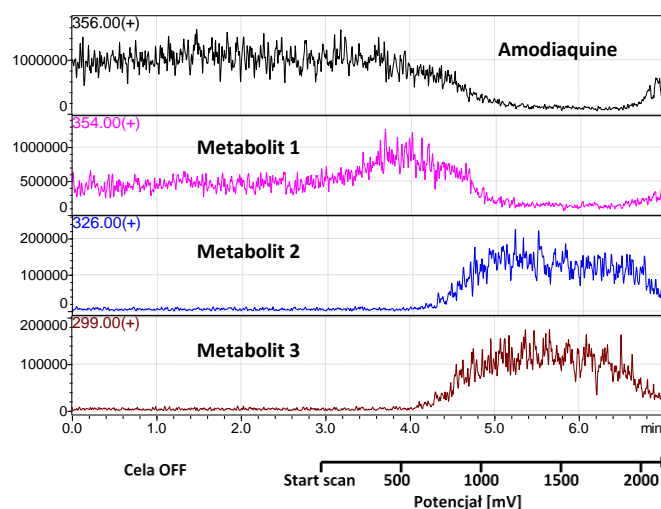
Tabela 5 Parametry pracy detektora podczas analizy LC-MS

Parametr	Opis
Spektrometr	LC/MS-2020 (Shimadzu)
Jonizacja	Pozytywna
DL Temperature	300°C
Heat Block	400°C
Nebulizer	1,5 l/min
Dry gas	15 l/min
Detector Voltage	2 kV
Interface Voltage	4,5 kV
DL Voltage	Default (0 V)
Qarray DC Voltage	Default (0 V)

WYNIKI

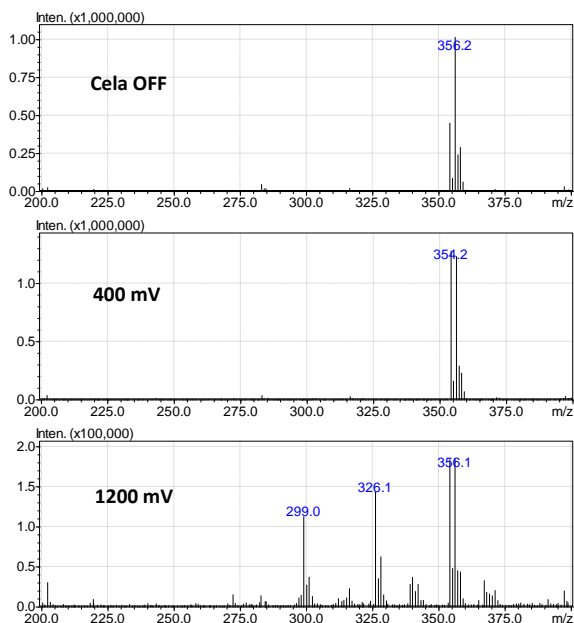
Metabolizm Fazy I

W Tabeli 1 przedstawiono główne metabolity amodiaquine oraz ich masy monoizotopowe, wykorzystane do interpretacji danych. Na Rys. 4 przedstawiono chromatogramy dla wybranych wartości m/z odpowiadających jonom dla amodiaquine (m/z 356) oraz metabolitów (m/z 354, 326, 299). Na podstawie przedstawionych voltamogramów masowych (patrz skala poniżej Rys. 4) ustalono optymalne wartości potencjałów dla wybranych produktów utleniania (400 mV dla metabolitu 1 oraz 1200 mV dla metabolitów 2 i 3). Na Rys. 5 przedstawiono przykładowe widma masowe zarejestrowane dla potencjałów 400 mV i 1200 mV oraz pomiar kontrolny przy wyłączonej celi elektrochemicznej.

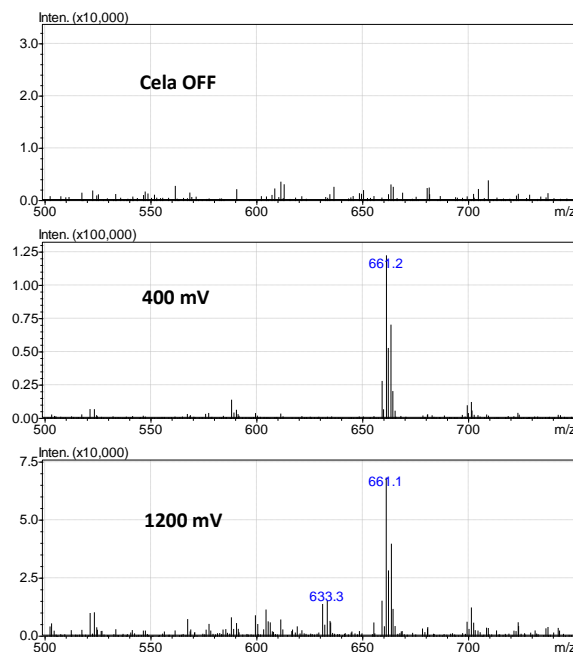


Rys. 4 Voltamogramy masowe zarejestrowane podczas elektrochemicznego utleniania amodiaquine

Chromatogramy dla wybranych jonów o m/z 356 (amodiaquine) oraz 299 (metabolit 3), uzyskane w wyniku analiz LC-MS, przedstawiono na Rys. 6. Dla potencjału 1200 mV widoczny jest sygnał pochodzący od metabolitu 3, a jednocześnie obserwuje się spadek intensywności jonu pochodzącego od badanego leku (chromatogram dla m/z 356). Przedstawiony eksperyment potwierdza możliwość analizy LC-MS uzyskanych produktów utleniania elektrochemicznego. Na uwagę zasługuje fakt, iż analiza nietrwałych produktów utleniania (takich jak metabolity 1 i 2) jest również możliwa, jak przedstawiono na Rys. 4.



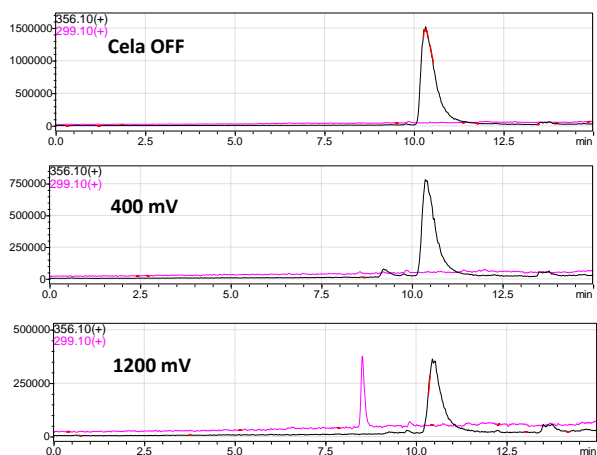
Rys. 5 Widma masowe – metabolizm Fazy I



Rys. 7 Widma masowe – metabolizm Fazy II

WNIOSKI

Połączenie systemów ROXY™ (Antec) oraz LC/MS-2020 (Shimadzu) (patrz Rys. 8) stwarza zaawansowany system umożliwiający symulację metabolizmu (zarówno Fazy I, jak i Fazy II) dla narkotyków, leków, herbicydów i innych związków istotnych w życiu człowieka. Przeprowadzenie analiz wymaga zaledwie kilku minut oraz umożliwia dogłębną analizę powstałych produktów z zastosowaniem chromatografii cieczowej w połączeniu ze spektrometrią mas.



Rys. 6 Chromatogramy analiz LC-MS obrazujące powstanie metabolitu 3 (m/z 299, różowy chromatogram)

Metabolizm fazy II

W celu potwierdzenia zachodzenia reakcji sprzężania metabolitów amodiaquine z glutationem (GSH), zapisano widma masowe po zmieszaniu produktów utleniania dla 400 mV i 1200 mV z roztworem GSH. Zarejestrowane widma masowe przedstawiono na Rys. 7. Uzyskane wyniki potwierdzają zachodzenie reakcji sprzężania z GSH dla metabolitów 1 i 2 (jony o m/z 661 i 633).



Rys. 8 Połączenie systemów ROXY™ (Antec) oraz LC/MS-2020 (Shimadzu)

Podziękowania

Serdecznie dziękujemy firmie Antec, Holandia, za użyczenie aparatury, wsparcie techniczne oraz cenne uwagi odnośnie użytkowania systemu elektrochemicznego ROXY™.